

4. PENGARUH METODE DAN PARAMETER EKSTRAKSI TERHADAP YIELD LUTEIN MIKROALGA HIJAU

Berbagai metode dari ekstraksi *lutein* dapat dilihat pada Tabel 4., metode yang digunakan berupa maserasi, *supercritical fluid extraction*, *ultrasonic assisted extraction*, *pressurized liquid extraction* dan *pulsed electric field assisted extraction*. Sampel yang digunakan berupa mikroalga hijau kelas *chlorophyceae* dengan spesies *Chlorococcum humicola*, *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus almeriensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella salina*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Muriellopsis sp.*

Sebelum melakukan *pre-treatment*, mikroalga perlu dipanen terlebih dahulu untuk memperoleh biomasnya namun tidak akan diulas secara mendalam pada *review* ini. Biomassa mikroalga hijau dapat diekstraksi dalam keadaan basah (*wet*) saat belum dikeringkan maupun keadaan kering (*dry*) saat sudah menjadi bentuk *powder*, metode pengeringan yang dapat dilakukan dengan metode pengeringan beku (*freeze-drying*) dan *spray drying*. Tahap penghancuran sel dapat dilakukan dengan *homogenizer*, penghancuran/penghalusan (*ground*), *ball mill*, *bead mill*. Penghancuran sel dalam ekstraksi mikroalga perlu dilakukan untuk mempermudah difusi *solvent* kedalam sel mikroalga karena beberapa jenis mikroalga memiliki dinding sel yang keras.

4.1. Tahap Pendahuluan (*Pre-treatment*)

Langkah terbaik untuk menentukan perlakuan pendahuluan adalah mengetahui jenis mikroalga yang akan diekstraksi karena mikroalga memiliki karakteristik biologi dan struktur dinding sel yang berbeda (Kim *et al.*, 2016). Bertujuan supaya ekstraksi yang dilakukan efisien dari segi energi maupun waktu terutama bila dilakukan dalam skala besar.

Pada Tabel 4., dapat dilihat *yield lutein* yang diperoleh spesies *Muriellopsis sp.* dengan metode pengeringan yang berbeda. Penelitian dilakukan oleh Ruiz-Domínguez *et al.*, (2020) diperoleh *yield lutein* dengan metode pengeringan *freeze drying* (4.79 ± 0.24 dan 4.55 ± 0.16 (% w/w)) memiliki *yield* yang lebih tinggi daripada metode pengeringan *spray drying* (1.52 ± 0.08 dan 1.84 ± 0.09 (% w/w)) pada kondisi ekstraksi yang sama, menghasilkan perbedaan *yield* yang signifikan.

Masing-masing metode memiliki kelebihan dan kekurangan, menurut Ruiz-Domínguez *et al.*, (2020) metode *freeze drying* adalah metode terbaik untuk menghilangkan kandungan air serta dapat menjaga komposisi senyawa, namun membutuhkan biaya yang mahal. Sedangkan metode *spray drying* dianggap lebih cepat namun dapat merusak komponen termolabil. Selain itu hasil menunjukkan metode *freeze drying* dapat meningkatkan *yield*. Metode *pre-treatment* lainnya seperti *ball milling* dan homogenisasi, belum dapat diulas lebih dalam karena metode ekstraksi serta parameternya belum dalam kondisi yang sama.

Pada Tabel 4., dapat dilihat berbagai jenis metode ekstraksi dengan spesies mikroalga, parameter *solvent*, suhu, waktu, tekanan, ultrasonik, dan kekuatan medan listrik yang berbeda. Data menunjukkan bahwa *yield lutein* yang diperoleh berbeda tiap metode ekstraksi dan spesies mikroalga yang digunakan. *Yield lutein* Mikroalga tiap spesies diambil yang terbaik, *Dunaliella salina* dengan *yield lutein* sebesar $(4,8 \pm 1,0 \text{ mg/g dw})$, *Chlorococcum humicola* $(1,22 \pm 0,01 \text{ mg/g dw})$, *Chlorella salina* $(2,92 \text{ mg/g dw})$, *Chlorella pyrenoidosa* $(117,75 \text{ mg/100 g dw})$, *Chlorella vulgaris* $(3,20 \pm 0,06 \text{ mg/g dw})$, *Scenedesmus almeriensis* $(2,210 \text{ mg/g dw})$, *Haematococcus pluvialis* $(4,03 \text{ mg/g dw})$. Hal tersebut membuktikan bahwa setiap mikroalga memiliki kandungan *lutein* yang berbeda-beda mengacu pada pembahasan di bab sebelumnya.

4.2. Maserasi

Berdasarkan Tabel 4., metode maserasi pada beberapa penelitian menggunakan berbagai pelarut untuk mengekstraksi *lutein* pada mikroalga, beberapa pelarut yang digunakan adalah *liquified DME*, *Methanol : Dichloromethane (3:1, v/v)*, *Ethanol, 5 ml (n-Hep-EtOH-H₂O, 5:4:1.5)*. Penelitian Fábryová *et al.*, (2019) dengan pelarut *n-Hep-EtOH-H₂O (5:4:1,5)* membuktikan ekstrak dari *Chlorella vulgaris* memiliki *yield* tertinggi $(1,33 \pm 0,09 \text{ mg/dw})$ dibandingkan dengan menggunakan pelarut lainnya.

Pada spesies *Chlorococcum humicola* dengan pelarut *liquified DME* $(1,22 \pm 0,01 \text{ mg/g Dw})$, *Dunaliella salina* dengan pelarut *Methanol : Dichloromethane (3:1, v/v)* $(950 \mu\text{g/g dw})$, dan *chlorella vulgaris* dengan pelarut *ethanol* $(163 \mu\text{g/g dw})$ belum memberikan hasil terbaik dibanding pelarut *n-Hep-EtOH-H₂O*. Hal ini Dijelaskan oleh Gong & Bassi, 2016 dimana sifat *like dissolves like*, dimana kepolaran larutan sangat berpengaruh

untuk memperoleh komponen target. Untuk memperoleh *yield* yang tinggi dalam ekstraksi biomassa, perlu mengetahui tingkat kepolaran komponen target supaya pelarut yang dipilih juga memiliki kepolaran yang relatif sama. Pada hal ini komponen target adalah *lutein*, termasuk jenis karotenoid golongan xantofil yang memiliki gugus fungsi polar (*hydroxyl*) sehingga memiliki tingkat kepolaran yang lebih tinggi dibanding karotenoid golongan *carotenes*. Diperkuat oleh Cerón-García *et al.*, (2018) bahwa penggunaan *tricomponent solution* dapat diperoleh hasil yang optimal dengan campuran *heptane*, *ethanol*, air karena memperluas *range* kepolaran larutan sehingga dapat mengikat komponen target lebih optimal. Penggunaan pelarut juga perlu dipertimbangkan seperti *tetrahydrofuran* (THF), *dichloromethane* (DMF) dianggap tidak aman bagi lingkungan serta *hexane* yang tidak direkomendasikan untuk aplikasi pada bahan pangan.

Pada metode maserasi *yield* yang diperoleh pada mikroalga *Chlorococcum* pada suhu 41°C sebesar (1,22±0,01 mg/g dw), selain itu pada Spesies *Dunaliella salina* diperoleh (950µg/g dw) pada suhu 4°C, sedangkan pada spesies *Chlorella vulgaris* yang diteliti Fábryová *et al.*, (2019) tidak dijelaskan secara detail suhu yang digunakan. Selain itu suhu juga memberikan perbedaan *yield chlorococcum humicola* dan *Dunaliella salina* dimana *yield lutein* menjadi lebih tinggi seiring meningkatnya suhu. Waktu maserasi menunjukkan peningkatan *yield lutein* dimana pada waktu 10 menit spesies *Dunaliella salina* diperoleh *yield lutein* (950 µg/g dw), 20 menit spesies *Chlorococcum humicola* diperoleh *yield lutein* ((1,22±0,01 mg/g dw), dan waktu 30 menit maserasi dengan spesies *Chlorella vulgaris* diperoleh *yield lutein* sebesar (1,33±0,09 mg/g dw), namun hal ini juga belum dapat dipastikan karena parameter *solvent* dan suhu yang digunakan masih berbeda. Berdasarkan ulasan diatas dapat disimpulkan metode ekstraksi maserasi pelarut, suhu dan waktu.

4.3. Supercritical Fluid Extraction (SFE)

Pada Tabel 4., dapat dilihat parameter yang digunakan dalam metode *supercritical fluid extraction* (SFE) adalah suhu, tekanan, waktu ekstraksi, pelarut CO₂, *cosolvent*, *flowrate* CO₂ dan *flowrate cosolvent*. Pada penelitian oleh Macías-Sánchez *et al.*, 2010, spesies mikroalga *Scenedesmus almeriensis* diperoleh *yield* sebesar (0,0466 mg/g dw).

Penelitian dari (Di Sanzo *et al.*, 2018) pada spesies *Haematococcus pluvialis* didapatkan *yield lutein* sebesar (4,03 mg/g dw) dan penelitian oleh (Yen *et al.*, 2012) pada spesies *Scenedesmus almeriensis* diperoleh *yield* sebesar (2,53 mg/g dw). Hal tersebut membuktikan bahwa setiap mikroalga memiliki kandungan *lutein* yang berbeda-beda.

Pada penelitian Di Sanzo *et al.*, 2018, peningkatan suhu ekstraksi menyebabkan penurunan *yield* pada seluruh data pada penelitian. Dalam penelitian tersebut *yield* tertinggi diperoleh menggunakan suhu 50°C dengan *yield* sebesar (4,03 mg/g dw). Dijelaskan dalam penelitiannya bahwa penyebab terjadinya degradasi *lutein* adalah karena instabilitas *lutein* terhadap suhu tinggi (Di Sanzo *et al.*, 2018). Namun hal menarik terjadi, bahwa dalam penelitian yang dilakukan oleh Yen *et al.*, (2012) data menunjukkan *yield lutein* semakin meningkat dengan bertambahnya suhu berbanding terbalik dengan penelitian yang dilakukan oleh Di Sanzo *et al.*, (2018). Suhu yang digunakan dalam penelitian Yen *et al.*, (2012) adalah (60, 70, 80 °C) dengan *yield lutein* berturut-turut sebesar (0,152 mg/g dw), (0,206 mg/g dw) dan (0,254 mg/g dw), membuktikan bahwa semakin tinggi suhu dapat meningkatkan *yield lutein* mikroalga.

Terjadi *paradoks* dimana pada penelitian Yen *et al.*, (2012) peningkatan *yield* terjadi seiring tingginya suhu sedangkan pada penelitian Di Sanzo *et al.*, (2018) *yield* menurun akibat peningkatan suhu. Hal tersebut dapat terjadi karena parameter yang berbeda dari penelitian Di Sanzo *et al.*, (2018) dan Yen *et al.*, (2012) adalah lama waktu ekstraksi dimana Di Sanzo *et al.*, (2018) menggunakan waktu 120 menit sedangkan Yen *et al.*, (2012) menggunakan waktu 60 menit. Kombinasi waktu ekstraksi dan suhu berpengaruh terhadap *yield*, dimana waktu ekstraksi yang terlalu lama dengan suhu tinggi dapat menyebabkan penurunan *yield* seperti yang terjadi pada penelitian Di Sanzo *et al.*, (2018) namun walaupun suhu yang digunakan tinggi tetapi waktu ekstraksi tidak terlalu lama maka kemungkinan *lutein* untuk terdegradasi akan sangat kecil. Meskipun demikian rata-rata *yield* tertinggi diperoleh pada penelitian oleh Di Sanzo *et al.*, (2018), dengan *yield* tertinggi diperoleh pada perlakuan dengan suhu 50°C. Bertambahnya suhu menyebabkan kelarutan *lutein* meningkat akibat tekanan uap zat terlarut (Ruen-Ngam *et al.*, 2012). Dimana cairan CO₂ ketika dalam tekanan dan suhu diatas ambang kritis akan memiliki bentuk fluida namun bersifat seperti gas dan meningkatkan kemampuan difusi

menjadi lebih tinggi sehingga mudah untuk melakukan penetrasi kedalam biomassa (Miazek *et al.*, 2017). Penurunan *yield* terjadi pada suhu 65°C, sehingga sebaiknya suhu yang digunakan tidak lebih dari 50°C.

Parameter tekanan ekstraksi *supercritical fluid extraction* pada penelitian Di Sanzo *et al.*, (2018) dengan spesies mikroalga *Haematococcus pluvialis*, perbedaan tekanan memberikan pengaruh yang signifikan dimana diperoleh sebesar (4,03 mg/g dw) pada tekanan 550 bar dan (2,53 mg/g dw) pada tekanan 400 bar. Pada penelitian lain dengan spesies mikroalga *Scenedesmus almeriensis* pada tekanan 400 bar belum memberikan hasil yang optimal dimana *yield* tertinggi diperoleh sebesar (2,210 mg/g dw). Hal ini dapat terjadi karena peningkatan tekanan menyebabkan kelarutan dari *lutein* meningkat sehingga akan mudah terpenetrasi oleh pelarut.

Parameter lainnya dari ekstraksi metode *supercritical fluid extraction* adalah *flow rate* CO₂. Pada penelitian oleh Di Sanzo *et al.*, (2018) ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *flow rate* CO₂ yang berbeda yaitu (3,62 g/min dan 14,48 g/min), sedangkan pada penelitian Macías-Sánchez *et al.*, (2010) digunakan flowrate CO₂ sebesar (1g/min). Pengaruh *flowrate* pada CO₂ memberikan hasil yang berbeda pada *yield lutein* yang diperoleh. *Yield lutein* yang diperoleh berturut-turut memperoleh *yield* sebesar (4,03 mg/g dw), (2,53 mg/g dw) dan (0,0466 mg/g dw). *Flowrate* yang lebih besar digunakan untuk memperoleh kemurnian yang tinggi, sedangkan *flowrate* yang rendah digunakan untuk memperoleh *yield* yang optimal. sesuai dengan data yang ditampilkan dimana *yield* dengan CO₂ *flowrate* (3,62 g/min) lebih besar dari *yield* dengan *flowrate* yang lebih tinggi (Di Sanzo *et al.*, 2018).

Pada Tabel 4., dapat dilihat *yield lutein* dengan berbagai parameter *flowrate* CO₂ berbeda, menghasilkan pengaruh yang signifikan. Parameter *flowrate* CO₂ yang menghasilkan *yield* tertinggi adalah (3,62 g/min), hal ini dapat terjadi karena *flowrate* rendah memberikan hasil *yield* optimal namun memiliki kemurnian yang lebih rendah dibanding *flowrate* yang lebih tinggi. Penggunaan *flowrate* yang lebih tinggi sebenarnya sangat cocok untuk diaplikasikan untuk tujuan *food product* karena potensinya untuk

mengeliminasi proses purifikasi karena kemurnian nya yang tinggi namun belum dijelaskan lebih detail dalam penelitian ini.

Parameter selanjutnya pada metode ini adalah penambahan *cosolvent* dan *flowrate cosolvent*, pada spesies *Scenedesmus almeriensis* tanpa penambahan *cosolvent* diperoleh *yield* sebesar (0,254 mg/g dw). Penambahan *cosolvent* menyebabkan peningkatan *yield lutein* dimana dengan penambahan *ethanol yield* yang diperoleh sebesar (1,794 mg/g dw) pada spesies yang sama. Peningkatan *yield* juga dipengaruhi oleh *flowrate cosolvent* sebesar (30 mol%) dimana *yield* yang diperoleh sebesar (2,210 mg/g dw). Penambahan *solvent* maka *yield lutein* yang diperoleh menjadi lebih tinggi dibanding ekstraksi *lutein* tanpa penggunaan (Yen *et al.*, 2012). Hal ini terjadi karena karena *range* kepolaran menjadi lebih tinggi karena penambahan *cosolvent* yang bersifat polar, sehingga dapat mengikat *lutein* yang bersifat lebih apolar. Sedangkan parameter *flowrate cosolvent* menyebabkan peningkatan kelarutan namun apabila jumlah *cosolvent* terlalu tinggi maka dapat membatasi difusi perpindahan masa sehingga terbentuk dua fase (*liquid* dan *supercriticalfluid*) menyebabkan rendahnya jumlah *lutein* yang diperoleh.

4.4. Pressurized Liquid Extraction (PLE)

Pada Tabel 4., dapat dilihat metode *Pressurized liquid extraction* (PLE) parameter-parameter yang digunakan adalah pelarut, suhu, tekanan dan waktu ekstraksi. Penelitian oleh Denery *et al.*, (2004) menggunakan *solvent acetone*. Ekstraksi dilakukan dengan parameter yang sama suhu 40°C, tekanan 1500 psi. Pada spesies *Haematococcus pluvialis*, *yield* diperoleh (1,1 ± 0,1 mg/g dw) sedangkan pada spesies *Dunaliella salina* *yield lutein* sebesar (4,8 ± 1,0 mg/g dw). Perbedaan *yield* sangat signifikan antar kedua spesies

Ekstraksi PLE dengan spesies *Dunaliella salina* dilakukan dengan pelarut *acetone*, tekanan 1500 psi dengan waktu ekstraksi yang berbeda (10 menit dan 20 menit). *Yield lutein* yang didapatkan berturut-turut sesuai dengan waktu ekstraksi sebesar (3,8±0,7 mg/g) dan (4,8±1,0 mg/g), menunjukkan semakin bertambahnya waktu ekstraksi maka waktu kontak pelarut dengan bahan juga semakin lama sehingga proses menjadi lebih

optimal. Tetapi dalam penelitian (Denery *et al.*, 2004) belum dilakukan ekstraksi dengan parameter tekanan yang berbeda sehingga belum diketahui pengaruh tekanan terhadap *yield lutein*. Pada metode ini suhu memberikan pengaruh yang signifikan, dimana terjadi peningkatan *yield lutein* seiring bertambahnya waktu ekstraksi.

Berdasarkan ulasan diatas pada metode ini dapat disimpulkan pelarut tidak memberikan pengaruh signifikan, Suhu memberikan pengaruh signifikan selain itu peningkatan suhu menyebabkan penurunan *yield*, waktu ekstraksi memberikan pengaruh signifikan, namun parameter tekanan belum dapat diulas karena keterbatasan data. Parameter optimal pada metode ekstraksi *pressurized liquid extraction* adalah penggunaan pelarut *acetone*, suhu ekstraksi 20°C, dan waktu ekstraksi 20 menit.

4.5. Ultrasound Assisted Extraction (UAE)

Pada Tabel 4., dapat dilihat metode *ultrasound assisted extraction* (UAE) dilakukan dengan 3 spesies mikroalga *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella salina*. Ekstraksi pada spesies *Chlorella vulgaris* dilakukan dengan menggunakan pelarut n-hep-EtOH-H₂O diperoleh *yield* sebesar (3.20 ± 0.06 mg/g dw), sedangkan penggunaan pelarut ethanol belum memberikan hasil yang optimal hanya diperoleh *yield lutein* sebesar (1,94 ± 0,05 mg/g dw) meskipun waktu ekstraksi dan suhu yang digunakan lebih lama dan tinggi sehingga seharusnya dapat memaksimalkan *yield lutein* yang diperoleh. Hal ini dapat terjadi karena pelarut n-hep-EtOH-H₂O yang merupakan *tricomponent solvent* sehingga memiliki *range* kepolaran yang lebih besar dibanding *solvent* lainnya

Parameter frekuensi atau daya ultrasonik, pada penelitian Fan *et al.*, (2015) dengan spesies mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* menggunakan intensitas daya ultrasonik sebesar (1000 W). Dapat dilihat pada Tabel 4., *yield lutein* yang diperoleh dari penelitian ini sebesar (117,75 mg/100g dw), terjadi peningkatan *yield lutein* seiring meningkatnya intensitas daya ultrasonik yang digunakan. Pada spesies *Chlorella vulgaris* dengan perbedaan ultrasonik 38 kHz dan 35 kHz juga diperoleh perbedaan *yield* yang signifikan dimana diperoleh berturut-turut (3.20 ± 0.06 mg/g dw) dan (1,94 ± 0,05 mg/g dw). Parameter daya dan frekuensi ultrasonik menyebabkan getaran kavitasi

meningkat selama proses ekstraksi sehingga menyebabkan pergerakan molekul. Tingginya perpindahan massa menyebabkan proses difusi *lutein* dalam mikroalga kedalam *solvent*, frekuensi ultrasonik rendah dianggap kurang optimal karena hanya mampu merusak dinding sel (Gayathri *et al.*, 2018).

Parameter selanjutnya adalah suhu ekstraksi, pada penelitian oleh Deenu *et al.*, (2013) dengan spesies mikroalga *Chlorella Vulgaris*, menerapkan parameter suhu ekstraksi yang berbeda 40 °C. Dapat dilihat pada Tabel 4., *yield* yang diperoleh sebesar (1,94 ± 0,05 mg/g dw), sedangkan pada penelitian Fábryová *et al.*, (2019), dengan suhu 25°C diperoleh *yield* yang lebih tinggi sebesar (3.20 ± 0.06 mg/g dw), kemudian pada spesies *Chlorella pyrenoidosa* dengan suhu 24°C hanya diperoleh *yield* sebesar (117,75 mg/100 g dw). Perbedaan *yield* dapat terjadi karena pengaruh parameter lain yang memiliki signifikansi lebih tinggi dibanding parameter suhu. Peningkatan suhu menyebabkan tekanan zat terlarut menjadi meningkat, gerakan termal molekul menjadi lebih cepat sehingga benturan antar molekul pelarut dan *lutein* akan sangat tinggi.

Berdasarkan ulasan diatas pada metode ini dapat disimpulkan Parameter pelarut memberikan pengaruh signifikan terhadap *yield lutein*, Parameter intensitas daya ultrasonik memberikan pengaruh yang cukup signifikan, Suhu dan waktu ekstraksi tidak memberikan pengaruh signifikan pada metode ini. Parameter optimal pada metode ekstraksi *ultrasound assisted extraction* adalah penggunaan pelarut (n-Hep–EtOH–H₂O, 5:4:1.5), Suhu ekstraksi sebesar 25°C, waktu ekstraksi 30 menit, dan Frekuensi ultrasonik optimal 38 kHz.

4.6. Pulsed Electric Field (PEF)

Pada Tabel 4., dapat dilihat dasarnya metode *Pulsed electric field assisted extraction* merupakan metode gabungan antara maserasi dan penghancuran sel dengan elektroporasi sehingga menyebabkan membran sel mengalami permeabilisasi. Pada penelitian yang dilakukan oleh (Luengo *et al.*, 2015). Diamati bahwa *pulsed electric field* dilakukan dengan kondisi suhu, waktu dan kekuatan medan listrik yang berbeda, kemudian dimaserasi pada suhu 20 °C dengan pelarut *ethanol*. *Yield* kontrol penelitian Luengo *et al.*, (2015) ini dapat dilihat pada Tabel 4., pada poin ekstraksi nomor 3 yang

diperoleh tanpa elektroporasi sebesar (163 μ g/g dw), sedangkan *yield lutein* dengan perlakuan elektroporasi tertinggi diperoleh (753,09 μ g/g dw).

Parameter waktu elektroporasi pada penelitian Luengo *et al.*, (2015) menggunakan durasi elektroporasi yang berbeda 150 μ s, dengan kekuatan medan listrik sebesar 25 kV/cm dan suhu 40°C. Dapat dilihat pada Tabel 5., *yield lutein* yang diperoleh sebesar (753,09 μ g/g dw). kekuatan medan listrik dan suhu berpengaruh menentukan permeabilitas sel setelah *treatment* elektroporasi, keberhasilan metode *pulsed electric field* ditentukan oleh proses elektroporasi supaya terjadi permeabilitas dalam membran sel. Permeabilitas membran sel dapat bersifat *irreversible* dan *reversible*, oleh karena itu elektroporasi yang hanya menyebabkan permeabilitas membran sel bersifat *reversible* maka setelah proses elektroporasi selesai membran sel dapat tertutup kembali hal ini dapat menyebabkan *yield* yang diperoleh kurang maksimal, berdasarkan data pada suhu 10°C dibutuhkan elektroporasi dengan kekuatan medan listrik diatas 15 kV/cm untuk memperoleh kondisi *irreversible electroporation* sedangkan pada suhu 25°C dan 40°C kekuatan medan listrik sebesar 10 kV/cm sudah dapat membuat sel terelektoroforasi secara permanen (*irreversible*).

Setelah dielektroforasi, *chlorella vulgaris* dimaserasi dengan suhu 25 °C dengan pelarut ethanol. Apabila *yield* dibandingkan dengan metode ekstraksi maserasi lain, penggunaan metode *pulsed electric field* belum menunjukkan dampak yang cukup signifikan dimana pada penelitian Fábryová *et al.*, (2019), dengan mikroalga yang sama diperoleh *yield lutein* sebesar (1,33 \pm 0,09 mg/g dw). Berdasarkan ulasan diatas pada metode ini disimpulkan *yield lutein* tanpa elektroporasi dan dengan perlakuan elektroporasi kondisi optimal memiliki perbedaan yang signifikan terhadap control namun hasil yang diperoleh lebih rendah dibanding ekstraksi lainnya, Parameter waktu elektroporasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap *yield*, Parameter suhu dan kekuatan medan listrik memberikan pengaruh yang signifikan terhadap *yield*. Kondisi optimal pada metode *pulsed electric field* adalah suhu 40° C, waktu elektroporasi 150 μ s, dan kekuatan medan listrik 25 kV/cm.

Tabel 4. *Yield Lutein* pada Mikroalga Hijau dengan Berbagai Metode Ekstraksi

| No | Spesies | Pre-Treatment | Parameter | | | Yield | Referensi |
|-----------------|------------------------------|--|---------------------------------------|------------|----------|-------------------|---------------------------------------|
| | | | Solvent | Suhu | Waktu | | |
| Maserasi | | | | | | | |
| 1 | <i>Chlorococcum humicola</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Digiling • Sentrifugasi 10.000 rpm, 5 menit • Disimpan di suhu -20°C dalam ruangan gelap • Dikeringkan beku | Liquified DME | 41 °C | 20 menit | 1,22±0,01 mg/g Dw | (Eghbali Babadi <i>et al.</i> , 2020) |
| 2 | <i>Dunaliella salina</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Sentrifugasi 5000g x 10 min, 4°C | Methanol : Dichloromethane (3:1, v/v) | 4 °C | 10 menit | 950 µg/g dw | (Y. Chen <i>et al.</i> , 2020) |
| 3 | <i>Chlorella vulgaris</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Sentrifugasi 3000 x g, 10 menit, suhu 25°C dalam buffer sitrat- | Ethanol | Suhu ruang | 20 menit | 163 µg/g dw | (Luengo <i>et al.</i> , 2015) |

| | | | | | | | | |
|---------------------------------------|--------------------------------|--|--|----------|-----------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| | | <i>fosfat pH 7</i> | | | | | | |
| 4 | <i>Chlorella vulgaris</i> | <ul style="list-style-type: none"> • high-pressure homogenizer • spray dried | 5 ml (n-Hep-EtOH-H ₂ O, 5:4:1.5). | 30 menit | | 1,33± 0,09 mg/g dw | (Fábryová <i>et al.</i> , 2019) | |
| Supercritical Fluid Extraction | | | | | | | | |
| 5 | <i>Scenedesmus almeriensis</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Sentrifugasi • Dikeringkan beku (<i>freeze dried</i>) • Digiling (<i>milled</i>) <p>Disimpan ditempat gelap (-30°C)</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ball millng</i> 400 rpm 5 menit | CO ₂ (1g/min) | 60 °C | 300 menit | 400 bar | 0,0466 mg/g dw | (Macías-Sánchez <i>et al.</i> , 2010) |
| 6 | <i>Haematococcus pluvialis</i> | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Mixed diatomaceous earth</i> 0,8g • homogenisasi | CO ₂ (3,62 g/min) | 50°C | 120 menit | 550 bar | 4,03 mg/g dw | (Di Sanzo <i>et al.</i> , 2018) |

| | | | | | | | | |
|----|--------------------------------|---|-------------------------------|------|-----------|---------|---------------|---------------------------------|
| 7 | <i>Haematococcus pluvialis</i> | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ball millng</i> 400 rpm 5 menit • <i>Mixed diatomaceous earth</i> 0,8g | CO ₂ (14,48 g/min) | 50°C | 120 menit | 400 bar | 2,53 mg/g dw | (Di Sanzo <i>et al.</i> , 2018) |
| 8 | <i>Scenedesmus almeriensis</i> | <ul style="list-style-type: none"> • homogenisasi • <i>freeze-dried</i> • <i>homogenised</i> • <i>stored 4 celcius</i> • <i>freeze-dried</i> | CO ₂ | 60°C | 60 menit | 400 bar | 0,152 mg/g dw | (Yen <i>et al.</i> , 2012) |
| 9 | <i>Scenedesmus almeriensis</i> | <ul style="list-style-type: none"> • <i>homogenised</i> • <i>stored 4 celcius</i> • <i>freeze-dried</i> | CO ₂ | 70°C | 60 menit | 400 bar | 0,206 mg/g dw | (Yen <i>et al.</i> , 2012) |
| 10 | <i>Scenedesmus almeriensis</i> | <ul style="list-style-type: none"> • <i>homogenised</i> • <i>stored 4 celcius</i> | CO ₂ | 80°C | 60 menit | 400 bar | 0,254 mg/g dw | (Yen <i>et al.</i> , 2012) |
| 11 | <i>Scenedesmus</i> | <ul style="list-style-type: none"> • <i>freeze-dried</i> | CO ₂ + Ethanol | 70°C | 60 | 400 bar | 1,794 mg/g | (Yen <i>et</i> |

| | | | | | | | | |
|--|--------------------------------|---|--|-------|----------|----------|---------------------|---------------------------------------|
| | <i>almeriensis</i> | <ul style="list-style-type: none"> • homogenised • stored 4 celcius • freeze-dried | | menit | | dw | <i>al.</i> , 2012) | |
| 12 | <i>Scenedesmus almeriensis</i> | <ul style="list-style-type: none"> • homogenised • stored 4 celcius | CO ₂ + Ethanol (30 mol%) | 70°C | 60 menit | 400 bar | 2,210 mg/g dw | (Yen <i>et al.</i> , 2012) |
| 13 | <i>Muriellopsis sp.</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Spray-dried | CO ₂ (3,62 g/min) + ethanol (15% v/v) | 40°C | 60 menit | 30 MPa | 1,52 ± 0,08 (% w/w) | (Ruiz-Domínguez <i>et al.</i> , 2020) |
| 14 | <i>Muriellopsis sp.</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Freeze-dried | CO ₂ (3,62 g/min) + ethanol (15% v/v) | 40°C | 60 menit | 30 MPa | 4.79 (% w/w) | (Ruiz-Domínguez <i>et al.</i> , 2020) |
| Pressurized liquid Extraction (PLE) | | | | | | | | |
| 15 | <i>Haematococcus pluvialis</i> | <ul style="list-style-type: none"> • lyophilized, • Disimpan (-20°C) | Acetone | 20°C | 15 menit | 1500 psi | 1,1 ± 0,1 mg/g dw | (Denery <i>et al.</i> , 2004) |
| 16 | <i>Dunaliella salina</i> | <ul style="list-style-type: none"> • lyophilized, • Disimpan (- | Acetone | | 10 min | 1500 psi | 3,8 ± 0,7 mg/g dw | (Denery <i>et al.</i> , 2004) |

| | | | | | | | | | |
|---|------------------------------|--|--|-------|----------|----------|---------------------|---------------------------------|--|
| | | | 20°C) | | | | | | |
| 17 | <i>Dunaliella salina</i> | <ul style="list-style-type: none"> • lyophilized, • Disimpan (-20°C) | Acetone | | 20 menit | 1500 psi | 4,8 ± 1,0 mg/g dw | (Denery <i>et al.</i> , 2004) | |
| Ultrasound Assisted Extraction (UAE) | | | | | | | | | |
| 18 | <i>Chlorella vulgaris</i> | <ul style="list-style-type: none"> • high-pressure homogenizer • spray dried | 5 ml (n-Hep-EtOH-H ₂ O, 5:4:1.5). | 25°C | 30 menit | 38 kHz | 3.20 ± 0.06 mg/g dw | (Fábryová <i>et al.</i> , 2019) | |
| 19 | <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | - | - | 24°C | - | 1000 W | 117,75 mg/100 g dw | (Fan <i>et al.</i> , 2015) | |
| 20 | <i>Chlorella vulgaris</i> | - | ethanol | 40°C | 2 jam | 35 kHz | 1,94 ± 0,05 mg/g dw | (Deenu <i>et al.</i> , 2013) | |
| 21 | <i>Chlorella salina</i> | • sentrifugasi | - | 40°C | 30 min | 35 kHz | 2,92 mg/g dw | (Gayathri <i>et al.</i> , 2018) | |
| Pulsed Electric Field Extraction (PEF) | | | | | | | | | |
| 22 | <i>Chlorella vulgaris</i> | • Sentrifugasi 3000 x g, 10 menit, suhu 25°C | buffer sitrat-fosfat pH7, | 40° C | 150 μs | 25 kV/cm | 753.09 μg/g dw | (Luengo <i>et al.</i> , 2015) | |